

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. Januar 2007 (04.01.2007)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2007/000408 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation:  
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2006/063470

(22) Internationales Anmeldedatum:  
22. Juni 2006 (22.06.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2005 029 810.9 27. Juni 2005 (27.06.2005) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EHBEN, Thomas [DE/DE]; Am Weissen Berg 20, 91085 Weisendorf (DE). ZILCH, Christian [DE/DE]; Hardenbergstr. 34, 04275 Leipzig (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT; Postfach 22 16 34, 80506 München (DE).

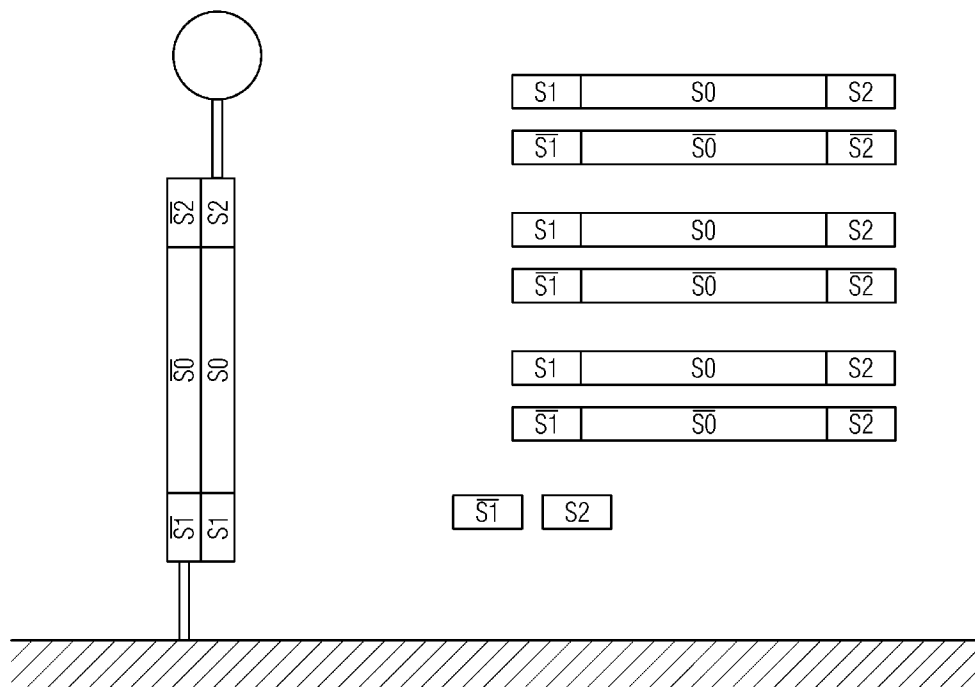
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING NUCLEOTIDE SEQUENCES, USE OF THE METHOD AND TEST KIT

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON NUKLEOTIDSEQUENZEN, VERWENDUNG DES VERFAHRENS UND TESTBESTECK



(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying nucleotide sequences while using non-labeled free oligonucleotides, labeled free and hybridizable oligonucleotides and non-labeled and immobilized oligonucleotides.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Nukleotidsequenzen unter Verwendung von nicht markierten, freien Oligonukleotiden, markierten, freien und hybridisierbaren Oligonukleotiden und nicht markierten und immobilisierten Oligonukleotiden.

WO 2007/000408 A1



EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**Veröffentlicht:**

- *mit internationalem Recherchenbericht*
- *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

## Beschreibung

Verfahren zum Nachweis von Nukleotidsequenzen, Verwendung des Verfahrens und Testbesteck

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Nukleotidsequenzen, wobei die Schritte der reversen Transkription und / oder Amplifikation, Hybridisierung und Detektion vorzugsweise in ein und derselben Reaktionskammer durchgeführt werden.

10

In den letzten Jahren haben Fortschritte in der Molekularbiologie sowie der Abschluss des HUGO-Projektes und damit die komplette Erfassung der Basenfolge der menschlichen DNA zu neuen Fragestellungen geführt, die in der biologischen Grundlagenforschung, in der Medizin und bei der Entwicklung von Medikamenten routinemäßig bearbeitet werden.

15

Zu diesen Fragestellungen gehört z.B. die Detektion einer Variation im Erbgut eines individuellen Organismus im Rahmen einer Genotypisierung. Beispiele für derartige Variationen sind die seltenen Punktmutationen in der genomischen DNA oder die häufigeren Punktmutationen an einer einzelnen Stelle der genomischen DNA (Single Nucleotide Polymorphism, SNP).

20

Von einer SNP wird der Literatur nach gesprochen, wenn die jeweilige Mutation in mindestens 1% der Organismen auftritt. Ein anderes Anwendungsgebiet ist die Expressionsanalyse, d.h. die Bestimmung des Grades der Aktivität (Expression) eines Gens in individuellen Zellen, Gewebetypen oder Organismen.

25

30

Beide Disziplinen führen zu Erkenntnissen über Funktionen, Störungen und Krankheiten von Organen und Geweben und werden häufig zur Bestimmung von Infektionskrankheiten oder in der Onkologie, z.B. zur Gewebetypisierung angewendet. Allgemein können diese Methoden überall dort zum Einsatz kommen, wo geeignete hybridisierbare Moleküle, wie z.B. Nukleinsäuren, bestimmt werden sollen. So umfasst das Gebiet der Anwendungen nicht nur die Humanmedizin oder Tiermedizin, sondern

35

auch die forensische Diagnostik, die Umwelt- und Lebensmittelanalytik oder den Pflanzenschutz.

Neben den etablierten Analyseverfahren, wie z.B. der Gelelektrophorese oder Massenspektrometrie, kommen hierfür seit  
5 einigen Jahren auch so genannte Mikroarrays zum Einsatz. Mikroarrays, manchmal auch als "Genchips" bezeichnet, sind die bedeutendste Gruppe der Biochips.

10 In einem Mikroarray kommt es zu chemischen Wechselwirkungen zwischen einer unbekanntem Probensubstanz und bekannten Referenzsubstanzen. Durch die Auswahl geeigneter Referenzsubstanzen und die Beobachtung des Verlaufs und der Ergebnisse der Wechselwirkungen lassen sich Erkenntnisse über die unbekanntem  
15 Probensubstanz erzielen. Als Referenzsubstanzen werden auf den Innenflächen der Reaktionskammern der Mikroarrays immobilisierte einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle verwendet (Fänger-Oligonukleotide), die komplementär zu den zu detektierenden Probenukleinsäuremolekülen sind. Im Nachfolgenden  
20 bezieht sich der Begriff Probenukleinsäuresequenz auch auf Templatnukleinsäuresequenz oder Zielnukleinsäuresequenz und der Begriff Probenukleinsäure auch auf Templatnukleinsäure oder Zielnukleinsäure.

25 Der Ablauf eines Experimentes mit Mikroarrays besteht meist aus folgenden Schritten:

- (1) Probenvorbereitung
- (2) a) Amplifikation der Zielsequenz(en), ggf. einschließlich Markierung und/oder  
30 b) reverse Transkription der Zielsequenz(en), ggf. einschließlich Markierung
- (3) soweit unter (2) keine Markierung erfolgt ist, ggf. zusätzliche Markierung der in (2) erhaltenen Amplikons
- (4) Hybridisierung der in (2) und/oder (3) erhaltenen ggf.  
35 markierten Amplikons mit unmarkierten Fänger-Oligonukleotiden und
- (5) Detektion der in (4) entstandenen markierten Hybridmoleküle.

Nachfolgend ist das Verfahren kurz detaillierter beschrieben:

- (1) Probenvorbereitung: Die zu analysierende Probe (z.B. Blut, Speichel, Gewebe, Pflanzen etc.) wird geeignet aufbereitet, i.d.R. um deren zu bestimmende Nukleinsäuren anzureichern und sie von den im Nachfolgenden, die Bestimmung störenden Substanzen abzutrennen.
- (2a) Amplifikation: Üblicherweise liegen die zu untersuchenden Nukleinsäuresequenzen nur in wenigen Kopien in einer Zelle vor und müssen daher zuerst vervielfacht werden. Dies geschieht häufig mit der Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaction", PCR) oder anderen dem Fachmann bekannten Verfahren.

Um eine bestimmte DNA-Sequenz im Sinne der allgemein gängigen PCR-Methode aus einer Probe zu vervielfachen, wird die Proben-DNA in Gegenwart einer DNA-Polymerase, den einzelnen vier Deoxyribonukleotiden (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) und einem Oligonukleotidpaar Zyklen von definierten Temperaturschwankungen unterworfen, die es ermöglichen, die einzelnen Schritte des Annealing (Anlagerung), der Elongation (Verlängerung) und der Denaturierung auszuführen. Das Oligonukleotidpaar wird i.d.R. so hergestellt, dass beide Oligonukleotide des Paares aus ca. 15 bis 30 Deoxyribonukleotiden aufgebaut sind, wobei ihre Sequenzen so gewählt sind, dass einer der beiden Oligonukleotide komplementär zu dem 5'-Ende des Sense-DNA-Stranges der Zielnukleinsäuresequenz ("upstream") und der andere komplementär zu dem 5'-Ende des Antisense-DNA-Stranges ("downstream") der Zielnukleinsäuresequenz ist.

Beim Annealing hybridisieren nun die beiden Oligonukleotide jeweils unmittelbar "upstream" und "downstream" der Zielsequenz.

Bei der Elongation ergänzt die DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) jedes an die Template-DNA gebundene Oligonukleotid in

5'- nach 3'- Richtung unter Einbau freier Deoxyribonukleotide im Sinne der Templatessequenz. Dieser Vorgang geht zunächst über das Ende der Zielsequenz hinaus, so dass Einzelstränge entstehen, die auf der einen Seite mit einer Oligonukleotidsequenz abschließen und auf der anderen Seite durch das Ende der Template-DNA bestimmt sind bzw. mit einer durch die Dauer des Amplifikationsschrittes bestimmten Nukleotidsequenz abschließen. Die so als Doppelstrang vorliegenden amplifizierten DNA-Einzelstrangsequenzen nennt man Amplikons.

10

Danach folgt eine weitere Denaturierung, und es beginnt ein erneuter PCR-Zyklus, d.h. Teilung des im vorhergehenden Schritt erhaltenen DNA-Doppelstranges und die Anlagerung von Oligonukleotiden "upstream" und "downstream" der Zielsequenz. Die folgende Elongation ist nun schon zum Teil durch die Länge des Überhangs begrenzt, und es entstehen Amplikons mit beidseitig endständigen Oligonukleotiden.

15

Während der weiteren Zyklen wird der Anteil der Amplikons mit beidseitig endständigen Oligonukleotiden prävalent gegenüber denen, die nicht auf beiden Seiten bündig mit den Oligonukleotidsequenzen abschließen.

20

Idealerweise verdoppelt sich mit jedem Zyklus die Anzahl der Amplikons, so dass z.B. nach 30 Zyklen pro Proben-DNA  $2^{30}$  Amplikons zur Verfügung stehen. Diese hohe Anzahl ist für die anschließende Hybridisierungsreaktion typischerweise ausreichend.

25

Das PCR-Protokoll, das die Temperaturen und die jeweiligen Zeitdauern der PCR-Zyklen festlegt, hängt hauptsächlich von der Länge und der Sequenz der zu detektierenden Zielsequenz, der Art der verwendeten Polymerase, den Konzentrationen von Additiven, wie z.B. Mg-Ionen, DMSO, Glycerin usw. und der Konzentration der Oligonukleotiden in der PCR-Lösung ab.

35

In den meisten Fällen werden die Zielmoleküle (z. B. amplifizierte DNA) mit molekularen Markern gekoppelt, mit deren Hil-

fe das Vorhandensein oder die Konzentration der relevanten DNA-Moleküle bestimmt werden können. Als Marker werden bevorzugt optisch aktive (z. B. fluoreszierende), magnetische, elektrochemische, biologische oder radioaktive Gruppen eingesetzt, die bereits mit den Oligonukleotidpaaren verknüpft sind. Es ist auch bekannt, dass sich im Zuge der Amplifikation durch Einbau von bereits markierten freien Deoxyribonukleotiden markierte Amplikons erhalten lassen.

10 Im Zuge der Amplifizierung können nicht nur eine, sondern auch mehrere Zielsequenzen aus der Probe amplifiziert werden. Hierzu verwendet man in der Amplifikationslösung Primer für diese verschiedenen Zielsequenzen. Die Amplifikationen dieser Zielsequenzen laufen dabei simultan ab. Dieses Multiplexing ist jedoch häufig auf eine kleine Anzahl von Zielsequenzen (Kanäle; Multiplexgrad) limitiert. Hauptsächlich ist diese Limitierung dadurch bedingt, dass jedes Primerpaar für eine optimale Amplifikationseffizienz spezifische Randbedingungen benötigt (z.B. Temperatur, Salzgehalt, Primerkonzentration, Zusammensetzung der Amplifikationslösung, Zyklus-Timing). Je mehr Primerpaare in der Lösung enthalten sind, desto größer werden für eine zunehmende Anzahl von Primerpaaren die Abweichungen der tatsächlichen Verhältnisse der Amplifikation von jeweiligen optimalen Reaktionsbedingungen. Dadurch kommt es zu Konzentrationsunterschieden zwischen den verschiedenen PCR-Produkten (Amplikons), die sich mit jedem PCR-Zyklus verstärken. Diese signifikanten Konzentrationsunterschiede bei den PCR-Produkten bei Abschluss der Reaktion erschweren die nachfolgende Hybridisierung erheblich, da sie dazu führen, dass die Signalintensität bei der Hybridisierung nicht repräsentativ für die Konzentration der entsprechenden zu untersuchenden Zielsequenzen ist. Die Fehlerhaftigkeit der Signalemission kann sogar so weit führen, dass die Signalintensitäten den dynamischen Meßbereich der Detektion übersteigen und die Erfassung einzelner Zielsequenzen erschweren.

(2b) Reverse Transkription (RT): Hier entfällt meist der Schritt der Amplifikation, da hier die von der Zelle reich-

lich produzierte mRNA in Gegenwart von freien Desoxyribonukleotiden und dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird. Die Menge der erhaltenen cDNA ist oftmals ausreichend für die weiteren Schritte. Gegebenenfalls kann  
5 weiterhin aber die cDNA auch mittels PCR amplifiziert werden (sog. "RT-PCR").

Es ist auch hier bekannt, dass sich im Zuge der reversen Transkription durch Einbau von bereits markierten freien Deoxyribonukleotiden, markierte cDNA erhalten läßt.  
10

(3) Markierung: Eine Markierung von amplifizierter oder cDNA ist auch in einem gesonderten Schritt mittels einer markierten Sonde möglich. Diese Sonde besteht aus einer mit einem  
15 Marker versehenen Oligonukleotidsequenz, die zu einem bestimmten Abschnitt der Zielsequenz komplementär ist.

Die DE 198 14 001 A1 beschreibt z. B. ein solches Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure durch Amplifikation eines  
20 Teilstückes der Zielsequenz mittels zweier Oligonukleotide in Anwesenheit einer Sonde mit verknüpfter Reporter- und Quenchergruppe, womit nach erfolgreicher Hybridisierung ein Signal gemessen werden kann.

25 (4) Hybridisierung: Die mit Markern ausgestatteten Zielmoleküle werden in einer Reaktionskammer mit an deren Innenseite immobilisierten hybridisierbaren Oligonukleotiden (Fänger-Oligonukleotid) in Kontakt gebracht. Nach einer erfolgten Hybridisierung eines Zielmoleküls mit einem Fänger-Oligonukleotid kommt es am Ort seiner Immobilisierung zu einer  
30 Häufung von Markern, deren Signalemission spezifisch für ein Bindungsereignis ist. So läßt eine hohe Signalstärke auf eine hohe Konzentration eines Zielmoleküls und damit auf die An- oder Abwesenheit z.B. eines SNPs oder einen hohen Aktivierungsgrad eines bestimmten Gens im Gewebe schließen.  
35

(5) Detektion: Die Signalerfassung kann einmal inhärent oberflächennah erfolgen. Hierbei werden aufgrund des Messverfah-

rens Signale von Markern, die nicht in der Nähe des Substrates gebunden sind, nicht erfasst, z.B. bei magnetischen Markern, die nur in unmittelbarer Substratnähe ein homogenes Magnetfeld beeinflussen, oder bei fluoreszierenden Molekülen im evaneszenten optischen Feld. Bei Verwendung von Verfahren, die keine inhärente Diskriminierung der Entfernung der signalgebenden Marker vom Substrat zulassen, z.B. Fluoreszenzoptik mit Durchleuchtung der gesamten Reaktionskammer, sind vor der Signaldetektion üblicherweise Waschschr

5  
10  
15

itte erforderlich, die alle nicht an die Bodenplatte gekoppelten Marker entfernt, um das störende Hintergrundsignal zu minimieren. Die Signaldetektion kann auch quantitativ erfolgen, was für die Expressionsanalyse unverzichtbar ist. Die Intensität der Signalemission stellt somit ein direktes Maß für die Aktivität eines Gens oder Genabschnittes dar.

Bei typischen Mikroarrays können auf ein und demselben Trägermaterial in bekannter Weise Spots von unterschiedlichen Fängermolekülen in einem Raster angeordnet sein, so dass eine Vielfalt von unterschiedlichen Zielnukleinsäuresequenzen (z.B. DNA oder mRNA) gleichzeitig (parallel) bestimmt werden kann. Je höher der Grad der Parallelisierung der Untersuchungen, die mit einem Array durchgeführt werden sollen, desto höher ist die erforderliche Anzahl verschiedener Spots. Die durch verschiedene Fängermoleküle nachzuweisenden Sequenzen werden dabei durch degenerierte Oligonukleotidpaare oder komplett verschiedene Oligonukleotidpaare während der PCR amplifiziert. Dies nennt man Multiplexing (siehe oben Multiplexing). Die Anzahl der Oligonukleotidpaare muss allerdings nicht genau mit der Anzahl der Spots identisch sein. So kann es z.B. verschiedene Spots mit identischen Fängern geben, die durch ihre Redundanz die Sicherheit des Untersuchungsergebnisses verbessern.

20  
25  
30

Um räumliche Inhibition der Hybridisierung zu vermeiden, werden die Fängermoleküle durch Spacermoleküle auf Distanz zur Array-Bodenplatte gehalten. Eine Hybridisierung findet dann statt, wenn ein signifikanter Teil der Zielsequenz zu dem der

35

Fängersequenz komplementär ist. In diesem Falle kommt es zu einer Konzentration von Markermolekülen in der Nähe des betreffenden Spots.

5 Mikroarrays werden für unterschiedliche Fragestellungen eingesetzt. Beim Genotyping werden z.B. Unterschiede einzelner Basen auf einem sonst identischen DNA-Abschnitt (SNPs) bestimmt. In diesem Falle muss eines der Oligonukleotide so konzipiert sein, dass dessen 3'-terminale Base komplementär  
10 zur Base auf der Original- bzw. Wildtypsequenz ist. Sollte nun im Falle eines SNPs dieser DNA-Sequenz ein 'Mismatch' auftreten, können die 3'-Base und die dazu komplementäre Base auf der Zielsequenz keine Bindung eingehen und die DNA-Polymerase kann schließlich das Oligonukleotid nicht verlängern.  
15 Es entstehen also keine Amplikons, die mit den Fängeroligonukleotiden hybridisieren könnten und es kommt so zu einem Ausbleiben einer Signalemission. Die Signalemission als Folge eines Hybridisierungsereignisses ist also ein Indikator für die vollständige Übereinstimmung der Oligonukleotidsequenz  
20 mit der entsprechenden Stelle auf der Ziel-DNA.

Alternativ hierzu kann ein Genotyping durchgeführt werden, indem man Spots für jede in Frage kommende genetische Variation aufbringt. Je nachdem, welche Variation in der Probe  
25 vorliegt, variieren die Schmelztemperaturen der Spots, was sich durch unterschiedlich starke Signalemissionen bei verschiedenen Temperaturen der Hybridisierungslösung erfassen lässt.

30 In der WO 01/34842 A2 ist ein Verfahren zur Analyse von PCR-Produkten auf einem Biochip beschrieben, bei welchem gemäß drei Primertypen verwendet werden: freie markiert, freie nicht-markierte sowie immobilisierte nicht-markierte Fänger-Primer. Bei der PCR entstehen markierte Amplikons, die auch  
35 an den Fänger-Primern verlängert werden.

Die WO 99/47701 A1 offenbart ein PCR-Verfahren, bei dem ein einzelsträngiges DNA-Molekül mit einem komplementären Primer

vermischt wird. Ein zweiter Primer ist komplementär zu Gegenstrang des DNA-Moleküls. Ein dritter Primer ist immobilisiert und komplementär zu der zu amplifizierenden Sequenz des DNA-Moleküls.

5

In der EP 1 186 669 A1 ist ein PCR-Verfahren beschrieben, bei dem zwei freie und ein immobilisierter Primer verwendet werden.

10 Nach dem Stand der Technik beschränkt sich der hier beschriebene Funktionsumfang des eigentlichen Mikroarrays auf die für die Hybridisierung erforderliche Hybridisierungskammer. Die Schritte der Probenvorbereitung (Isolation der Nukleinsäuren und ggf. die Markierung) und der Amplifikation finden außerhalb des Mikroarrays statt und müssen manuell durchgeführt  
15 werden.

Bei einigen Konzepten beinhaltet der Biochip neben dem eigentlichen Mikroarray zusätzlich mikrofluidische Komponenten,  
20 die der Integration von Probenvorbereitung, Amplifikation und Markierung dienen. Dies ist z.B. bei der "directif®"-Plattform der November AG gegeben. Hierbei muss eine Vielzahl von mechanischen, fluidischen und elektrischen Komponenten auf engem Raum integriert werden ("Lab-on-a-Chip"), was zu hohen  
25 Kosten der meist nur einmal verwendbaren Biochips führt. Zudem ist die Funktion eines solchen integrierten, miniaturisierten Gesamtsystems aufgrund der hohen Komplexität sehr anspruchsvoll.

30 Einige Konzepte verzichten zur Vereinfachung des Gesamtprozesses auf eine Markierung der Zielmoleküle. Diese Verfahren kommen wegen ihrer geringen Sensitivität allerdings nicht für die Methode der Expressionsanalyse in Frage.

35 Da alle bisher bekannten Biochipplattformen die einzelnen Prozessschritte sequentiell und in unterschiedlichen Reaktionskammern durchführen, lassen sich einzelne Schritte nicht

während ihres Ablaufes verfolgen und kontrollieren. So muss z.B. die Amplifikation immer bis zum Ende durchgeführt werden und kann nicht zu einem geeigneten früheren Zeitpunkt terminiert werden.

5

Eines der Hauptprobleme des Konzeptes von Mikroarrays ist die Anzahl der einzelnen Prozessschritte, die erforderliche Präzision und der Geräteaufwand, mit der sie durchgeführt werden müssen. Die Einzelschritte erfordern spezielle Ausstattung, Erfahrung und Kenntnisse und stellen häufig einen begrenzenden Faktor für die Reproduzierbarkeit des Gesamtergebnisses eines Mikroarray-Experimentes dar. Vor allem einem potentiellen Transfer des Mikroarraykonzeptes von der Forschung in die diagnostische Routine steht dieser Umstand entgegen.

10

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Durchführung eines Mikroarrays zu etablieren, das die aus dem Stand der Technik bekannten Nachteile vermeidet.

15

Die vorliegende Erfindung ist durch die nachfolgenden unabhängigen Ansprüche gekennzeichnet. Bevorzugte Ausführungsformen sind Gegenstand der Unteransprüche oder nachfolgend beschrieben.

20

Nach der vorliegenden Erfindung findet die

(I) Amplifikation der Zielmoleküle,

(II) die Hybridisierung und die

(III) Detektion

vorzugsweise in ein und derselben Reaktionskammer statt.

25

Dadurch wird ein hoher Grad an Systemintegration ermöglicht und die Prozessintegration führt zu geringeren Anfälligkeiten des Gesamtprozesses gegenüber Schwankungen der Einzelprozesse.

30

Vor Beginn der Amplifikation weist die Reaktionskammer des Mikroarrays, jeweils mit der Ziel-Nukleotidsequenz hybridisierbare

- nicht markierte freie, d. h. nicht immobilisierte, Oligonukleotide (nachfolgend hier kurz „nicht-markierte Oligonukleotide“ genannt),
- markierte, freie, d. h. nicht immobilisierte Oligonukleotide (nachfolgend hier kurz „markierte Oligonukleotide“ genannt) und
- an die Kammerwände der Reaktionskammer oder an ein anderes Trägermaterial gebundene nicht-markierte und immobilisierte Oligonukleotide (nachfolgend hier kurz „Fänger-Oligonukleotide“ genannt) auf.

Die obigen Oligonukleotide bestehen vorzugsweise aus 5 bis 100 und insbesondere aus 10 bis 30 oder auch nur 15 bis 25 Nukleotiden. Für die Fänger-Oligonukleotide ist die Anzahl der Nukleobasen nicht besonders entscheidend, so dass diese alternativ auch aus längeren Nukleinsäuresequenzen aufgebaut sein können.

Vorzugsweise ist die Anzahl der nicht-markierten Oligonukleotiden übersteigt größer als dabei die Summe aus markierten Oligonukleotiden und Fänger-Oligonukleotiden. Die nicht-markierten Oligonukleotidpaare dienen als Starter der nachfolgenden Primer-Extension zur Bildung erster Amplikons während der ersten Zyklen an den markierten und Fänger-Oligonukleotiden.

Es kommen in der Lösung sowohl Sense- als auch Antisense-Primer für eine bestimmte Zielsequenz vor. Das Verhältnis zwischen nicht-markierten Sense- und Antisense-Primern für jeweils eine bestimmte Zielsequenz kann im gesamten Bereich zwischen den Extremfällen „Nur Sense“ oder nur „Nur Antisense“ variiert werden. Hierdurch wird der Grad der asymmetrischen Asymmetrie der PCR bestimmt. Je höher die Konzentrationsunterschiede der nicht-markierten Sense- und Antisense-Primer, desto geringer ist die Bildung doppelsträngiger, frei in Lösung gebildeter Amplikons. Die Reaktion wird dadurch gedämpft, und es kommt zu einem linearen Prozessverlauf, da der Lawinencharakter der Reaktion weniger ausgeprägt ist. (Über-

gang einer exponentiellen Amplikonbildung in eine Lineare)  
Diese Dämpfung und Linearisierung begünstigt die PCR-Multiplexfähigkeit der Amplifikation, da es nicht zu lawinenartig fortpflanzenden Konzentrationsdifferenzen verschiedener Zielsequenzen kommt. Eine weitere die PCR-Multiplexfähigkeit der Amplifikation begünstigende Wirkung der Asymmetrie ist das im Extremfall vollständige Fehlen unmarkierter Amplikons, die durch ihre eigene Hybridisierung die des markierten Amplikons inhibieren. Eine dritte die PCR-Multiplexfähigkeit der Amplifikation begünstigende Wirkung der Asymmetrie ist die mit dem Grad der Asymmetrie zunehmende Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes von der Elongation markierter Primer. Diese wird begrenzt durch die Einschränkung der Diffusionsbewegung dieser Primer, die durch Masse und Volumen vor allem großer Marker, z.B. magnetischer Beads, bewirkt wird.

Erfindungsgemäß werden die an die Marker gebundenen Primer (markierte Oligonukleotide) mittels PCR oder Primer-Extension verlängert. Dies führt zu einem Einzelstrang, der im nachfolgenden mit einem zu ihm komplementären und an einer Trägeroberfläche immobilisierten Strang, gebildet aus einer weiteren PCR-Reaktion oder Primer-Extension, hybridisiert und so als funktionaler Spacer (Brücke) zwischen dem Marker und der Trägeroberfläche wirkt. Der Marker wird somit erfindungsgemäß an ein Trägermaterial immobilisiert und kann mit oben genannten Methoden detektiert werden.

Zusätzlich kann durch die Wahl unterschiedlicher Primerpaare (Sense- und Antisense-Primer) eine PCR-Multiplex-Reaktion durchgeführt werden. Der Multiplex-Grad (d.h. die Anzahl unterschiedlicher PCR-Produkte in einer Reaktion) wird durch ein unausgewogenes Konzentrationsverhältnis nicht-markierter Sense- und Antisense-Primer im Verhältnis zum korrespondierenden markierten Primern (Bsp. Oligonukleotide an einem magnetischen Bead) begünstigt. Befinden sich sämtliche markierten Sense-Primer beispielsweise an einem voluminösen Marker (Bsp. Bead-Träger) und der Antisense-Primer liegt frei in Lösung vor, so geht die PCR nach Elongation der meisten gebundenen Primer zunehmend in die lineare Amplifikationsphase.

Die Konzentrationsunterschiede der gebildeten Amplikons einer jeden Sequenz sind dann nicht so hoch als bei einer konventioneller PCR-Multiplex-Reaktion, so dass bei der nachfolgenden Hybridisierung eine wesentlich größere Anzahl verschiedener Sequenzen mit immobilisierten Oligonukleotiden nachgewiesen werden könne

Hybridisierungsschritte lassen sich erfindungsgemäß nach jedem PCR-Zyklus durchführen, sobald erste Hybridisierungsereignisse markierter Amplikons erwartet werden können. So erhält man eine Aussage über das dynamische Hybridisierungsverhalten, indem man Detektionssignale aufeinanderfolgender PCR-Zyklen miteinander vergleicht. Dadurch hat man Kontrolle darüber, ob sich die Amplifikation in einem frühen Amplifikationsbereich oder in der Sättigung befindet und erreicht eine wesentlich bessere Quantifizierung der Messergebnisse. Außerdem erhält man dadurch ein Abbruchkriterium für den gesamten Prozess. Einem Hybridisierungsschritt kann dann ggf. nachfolgend wieder ein Amplifikationsschritt angeschlossen werden.

Weiterhin lässt die Erfindung durch den hohen Anteil nicht-markierter Oligonukleotiden und die im Vergleich geringere erforderliche Konzentration markierter Oligonukleotiden in der Reaktionslösung den Einsatz großer Markergruppen, wie z.B. magnetischer Beads in kleinen Reaktionskammern zu.

Die Erfindung macht es auch möglich, der Reaktionslösung während des Prozesses (I) bis (III) keine zusätzlichen Reagenzien zuzuführen. Alle zur Reaktion benötigten Reagenzien können somit entweder vorgemischt oder in der Reaktionskammer trocken gelagert vorliegen.

Das Auslesen sollte im Sinne der Erfindung oberflächennah geschehen, da so durch das Entfallen von Waschschritten der Vorteil der einfachen Fluidik voll zur Geltung kommt.

Für das erfindungsgemäße Verfahren können die in der Beschreibungseinleitung beschriebenen Mikroarrays bzw. das dort

beschriebene Verfahren eingesetzt werden, unter der Voraussetzung, dass das Verfahren weiter die Merkmale der vorliegenden Erfindung aufweist.

5 In der Ausführungsform der Erfindung, wonach diese zur Expressionsanalyse bestimmter Gene eingesetzt wird, können im Wesentlichen zwei Verfahren eingesetzt werden.

10 (1) Durch Vorlagerung des Schrittes der reversen Transkription vor die Amplifikation (z.B. durch RT-PCR) kann das erfindungsgemäße Verfahren wie oben ausgeführt übernommen werden.

15 (2) Auf den Amplifikationsschritt kann ganz verzichtet werden, wenn eine ausreichende Menge an mRNA in der Probe vorliegt, dann wird der Schritt der Amplifikation durch eine reverse Transkription, die die mRNA in cDNA unter gleichzeitiger Markierung übersetzt.

20 Gegenstand der Erfindung ist somit weiterhin die Gegenwart von markierten Oligo(T)-Nukleotiden und der Einsatz von Reverser Transkriptase. Die Fänger-Oligonukleotide müssen dabei u. U. entsprechend verlängert gewählt werden, um die erwünschte Hybridisierung zu erzielen und werden so typischerweise aus 20 bis 100, bevorzugt aus 20 bis 50 Nucleobasen bestehen.

30 Das erfindungsgemäße Verfahren kann auf allen Gebieten, auf denen Nucleinsäureanalysen betrieben werden, angewandt werden wie z. B. in der medizinischen, forensischen, Lebensmittel- und Umweltanalytik, im Pflanzenschutz, der Tiermedizin oder allgemein in der Life Science Forschung.

35 Da die PCR einleitend überwiegend mit unmarkierten Oligonukleotiden stattfindet, entstehen so unmarkierte Amplikons (Figur 1). Da im Laufe der PCR-Zyklen die Konzentration nicht-markierter Oligonukleotide abnimmt, kommt es in zunehmendem Maße zu Annealing- (Figur 3), Elongations- (Figur 4)

und Denaturierungsvorgängen (Figur 5) unter Beteiligung von markierten Oligonukleotiden und von Fänger-Oligonukleotiden.

Hybridisierungen zwischen von markierten Oligonukleotiden und von Fänger-Oligonukleotiden gebildeten elongierten Oligonukleotiden werden erfindungsgemäß eingeleitet, indem nach Abschluss der Denaturierung eines PCR-Zyklus auf einer Temperatur oberhalb der Denaturierungstemperatur Hybridisierungstemperatur verharret wird (Figur 6). Dadurch kommt es nicht zu einer festen Anbindung von noch freien Oligonukleotiden an die jeweils komplementären Stellen der Amplikons. Im Unterschied hybridisieren jetzt die an der Reaktionskammerwand oder anderweitig immobilisierten aus der PCR gebildeten Fänger-Amplikons mit ihren komplementären, markierten Amplikons aus der Reaktionslösung. Da ihre Sequenz wesentlich länger ist als die der markierten und nicht-markierten Oligonukleotide (z.B. um den Faktor 2 bis 100, vorzugsweise 10 bis 50), bleibt die Hybridisierung auch unter der herrschenden, gegenüber der Annealingtemperatur erhöhten Temperatur stabil. Die herrschende Temperatur sollte also oberhalb der Schmelztemperatur der relativ kurzen Primer und unterhalb der Schmelztemperatur der relativ langen Amplikons liegen.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Figurenbeschreibung beispielhaft dargestellt.

Die Figuren 1 bis 6 stellen den schematischen Verlauf des Verfahrens dar. Die Zielsequenz (S0) ist durch die Sequenzen S1 and S2 begrenzt, wobei im Allgemeinen S1 oder S2 auch noch Teil der Zielsequenz sein können. Die jeweils komplementären Sequenzen sind durch "S0-Überstrich", "S1-Überstrich" oder "S2-Überstrich" gekennzeichnet. Im folgenden Text werden diese als S0\*, S1\* und S2\* bezeichnet.

Die Figur 1 stellt den Beginn der PCR-Reaktion dar, wobei die immobilisierten (mit der Sequenz S1\*) und markierten Oligonukleotide (mit der Sequenz S2) erfindungsgemäß in weitaus geringerer Konzentration vorliegen können als die nicht-mar-

kierten Oligonukleotide (S1\* und S2). Sie werden deshalb zuerst mit der Zielsequenz (S0) oder (S0\*) bzw. (S1+S0+S2) oder (S1\*+S0\*+S2\*) eine Amplifikation eingehen.

- 5 Figur 2 stellt den Verlauf einer PCR-Reaktion dar, die bis dahin hauptsächlich nur Amplikons generierte, die die in Überzahl vorhandenen nicht-markierten Oligonukleotide (S1\* und S2) beanspruchten.
- 10 Figur 3 stellt den weiteren Verlauf des erfindungsgemäßen Verfahrens dar, wobei jetzt die zuvor nach Figur 2 generierten Amplikons als Template für die markierten (S2) und die Fänger-Oligonukleotide (S1\*) dienen.
- 15 Figur 4 zeigt die vollständig verlängerten Amplikons aus Figur 3.

Figur 5 zeigt die durch z.B. Temperaturerhöhung ausgelöste Teilung der in Figur 4 generierten Doppelstränge in seine  
20 beiden Einzelstränge (Amplikons).

Figur 6 zeigt schließlich die erfindungsgemäße Hybridisierung zwischen den erhaltenen markierten und Fänger-Amplikons aus Figur 5. Zwar treten die unmarkierten, in höherer Konzentration gelösten Oligonukleotide in Konkurrenz zu den markierten,  
25 jedoch sollte dies eine ausreichende Hybridisierung markierter Oligonukleotide nicht behindern, da die Dichte der dort gebildeten Fänger-Amplikons so hoch ist, dass es in unmittelbarer Nähe des Spots zu einer Konzentrationsabnahme von  
30 Amplikons kommt und daher eine Sättigung der Fänger des Spots nicht den begrenzenden Faktor bei der Hybridisierung mit markierten Amplikons darstellt.

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis zumindest einer Ziel-  
Nukleotidsequenz umfassend die nachfolgenden Schritte
- 5 (a) Bereitstellen von mit zumindest einer Ziel-  
Nukleotidsequenz hybridisierbaren  
- nicht markierten, freien Oligonukleotiden, im Folgenden  
nicht-markierte Oligonukleotide genannt,  
- markierten, freien, hybridisierbaren Oligonukleotiden,  
10 im Folgenden markierte Oligonukleotide genannt und  
- nicht markierten und immobilisierten Oligonukleotiden,  
im Folgenden Fänger-Oligonukleotide genannt;
- (b) Bereitstellen der Probensubstanz in die Reaktionskammer,  
wobei die Probensubstanz die Ziel-Nukleotidsequenz(en)  
15 (b.1) umfasst oder  
die Ziel-Nukleotidsequenz(en) aus der Probensubstanz  
durch reverse Transkription herstellbar ist (sind) (b.2),  
wobei in diesem Fall
- (c) eine reverse Transkription einer RNA zur Herstellung von  
20 markierten und/oder nicht-markierten Ziel-  
Nukleotidsequenzen (b.2) in der Reaktionskammer durchge-  
führt wird;
- (d) Amplifikation (d.1) umfassend die Ziel-  
Nukleotidsequenz(en) gemäß (b.1), die nicht-markierten  
25 Oligonukleotide, die markierten Oligonukleotide und die  
Fänger-Oligonukleotide zur Herstellung von markierten  
Amplikons, nicht-markierten Amplikons sowie Fänger-  
Amplikons, oder  
Verzicht (d.2) auf die Amplifikation soweit die Ziel-  
30 Nukleotidsequenzen nach (b.2) durch reverse Transkription  
mittels der markierten Oligonukleotide in ausreichender  
Zahl gewonnen wurden und für diesen Fall die Fänger-  
Oligonukleotide aus Schritt (a) zur Herstellung von mar-  
kierten Nukleotidsequenzen bereitstehen;
- 35 (e) Hybridisierung der nach (d.1) hergestellten markierten  
Amplikons mit den immobilisierten Fänger-Amplikons (e.1),  
wobei die Dichte der gebildeten Fänger-Amplikons so hoch  
ist, dass es in unmittelbarer Nähe derselben zu einer

Konzentrationsabnahme von freien markierten und nicht-markierten Amplikons kommt und daher eine Sättigung der Fänger-Amplikons nicht den begrenzenden Faktor bei der Hybridisierung mit markierten Amplikons darstellt

5

oder

Hybridisierung der nach (d.2) hergestellten markierten Nukleotidsequenzen mit den Fänger-Oligonukleotiden (e.2);

(f) Detektion der Fänger-Amplikons oder der Fänger-Oligonukleotide aus (e.1) bzw. (e.2),

10

wobei nach Schritt (b) alle zur Durchführung des Verfahrens benötigten Reagenzien in einer Reaktionskammer vorhanden sind und während der weiteren Durchführung des Verfahrens nichts zugegeben wird.

15

2. Verfahren nach Anspruch 1, , dadurch gekennzeichnet dass

(g) nach Schritt (f) eine erneute Amplifizierung nach Schritt (d.1) durchgeführt wird.

20

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte (a) bis (g) in ein und derselben Reaktionskammer ausgeführt werden.

25

4. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte (a) bis (d) und (e) bis (f) in jeweils einer Reaktionskammer ausgeführt werden.

30

5. Verfahren gemäß zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Fänger-Oligonukleotide an der Reaktionskammer immobilisiert sind.

35

6. Verfahren gemäß zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die markierten Oligonukleotide an Beads gekoppelt sind.

7. Verfahren gemäß zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Ampli-

fikation eine PCR aufweisend eine Anzahl von Denaturierungs-, Annealing- und Elongationszyklen unter Einwirkung eines Temperaturzykluses umfasst.

- 5 8. Verfahren gemäß zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchenden Sequenzen bevorzugt aus DNA bestehen und die Oligonukleotide aus 5 bis 1000, bevorzugt aus 10 bis 100 und besonders bevorzugt aus 15 bis 30 Nukleobasen  
10 bestehen.
9. Verfahren gemäß zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Marker optisch, elektrochemisch, enzymatisch, magnetisch, gravimetrisch, radioaktiv oder durch Hap-  
15 ten/Antikörperwechselwirkungen bestimmt werden oder Ladungsträger aufweisen oder solche erzeugen.
10. Verfahren gemäß zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren die Schritte (f) und (g) in mehrfacher Folge umfasst.  
20
11. Verfahren gemäß zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Marker oberflächennah, ggf. durch die Lösung hindurch, detektiert werden.  
25
12. Verfahren gemäß zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die nicht-markierten Oligonukleotide in höherer Konzentration als die Summe der markierten Oligonukleotide und der Fänger-Oligonukleotide vorliegen.  
30
13. Verfahren gemäß zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest 2, vorzugsweise zumindest 5, unterschiedliche nicht-markierte Oligonukleotide und zumindest 2, vorzugsweise  
35

zumindest 5, unterschiedliche markierte Oligonukleotide mit jeweils zumindest 2, vorzugsweise zumindest 5, verschiedenen in der Probensubstanz enthaltenden Zielsequenzen hybridisieren in einem Verfahren des Mehrkanal-Multiplexings.

5

14. Verwendung des Verfahrens gemäß zumindest einem der vorhergehenden Ansprüche für das Genotyping oder die SNP-Analyse umfassend die Amplifikation nach (d.1).

10

15. Verwendung des Verfahrens gemäß zumindest einem der Ansprüche 1 bis 5 und 8 bis 13 zur Genexpressionsanalyse ggf. umfassend zusätzlich eine Amplifikation nach (d.1).

15

16. Verwendung gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchenden Sequenzen bevorzugt aus RNA bestehen und die Oligonukleotide aus 5 bis 1000, bevorzugt aus 10 bis 100 und besonders bevorzugt aus 15 bis 30 Nukleobasen bestehen.

20

17. Testbesteck aufweisend nur eine Reaktionskammer umfassend

25

- nicht markierte, freie Oligonukleotide, im Folgenden nicht-markierte Oligonukleotide genannt,
- markierte, freie Oligonukleotide, im Folgenden markierte Oligonukleotide genannt und
- nicht markierte und immobilisierte Oligonukleotide, im Folgenden Fänger-Oligonukleotide genannt,
- Trägermaterial für die Fänger-Oligonukleotide vorliegend als Bestandteil der Reaktionskammer oder in der Reaktionskammer befindlich, wobei die Fänger-Oligonukleotide in hoher Dichte am Trägermaterial immobilisiert sind, und
- Reagenzien umfassend zumindest Reaktionslösung, Enzyme, freie Desoxyribonukleotide, Puffer und Additive.

35

18. Testbesteck gemäß Anspruch 17 aufweisend als Additive zumindest eine der nachfolgenden Substanzen: DMSO, Glycerin, und Mg-Ionen.
- 5 19. Testbesteck gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die nicht-markierten Oligonukleotide in höherer Stückzahl als die Summe der markierten Oligonukleotide und der Fänger-Oligonukleotide zugesetzt sind.
- 10
20. Testbesteck gemäß den Ansprüchen 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest 2, vorzugsweise zumindest 5, unterschiedliche nicht-markierte Oligonukleotide und zumindest 2, vorzugsweise zumindest 5, unterschiedliche markierte Oligonukleotide mit jeweils zumindest 2, vorzugsweise zumindest 5, verschiedenen in der Probensubstanz enthaltenden Zielsequenzen hybridisieren in einem Verfahren des Mehrkanal-Multiplexings.
- 15
- 20 21. Verfahren gemäß zumindest einem der Ansprüche 1 bis 13 unter Verwendung des Testbestecks gemäß Ansprüchen 17 bis 20.

FIG 1

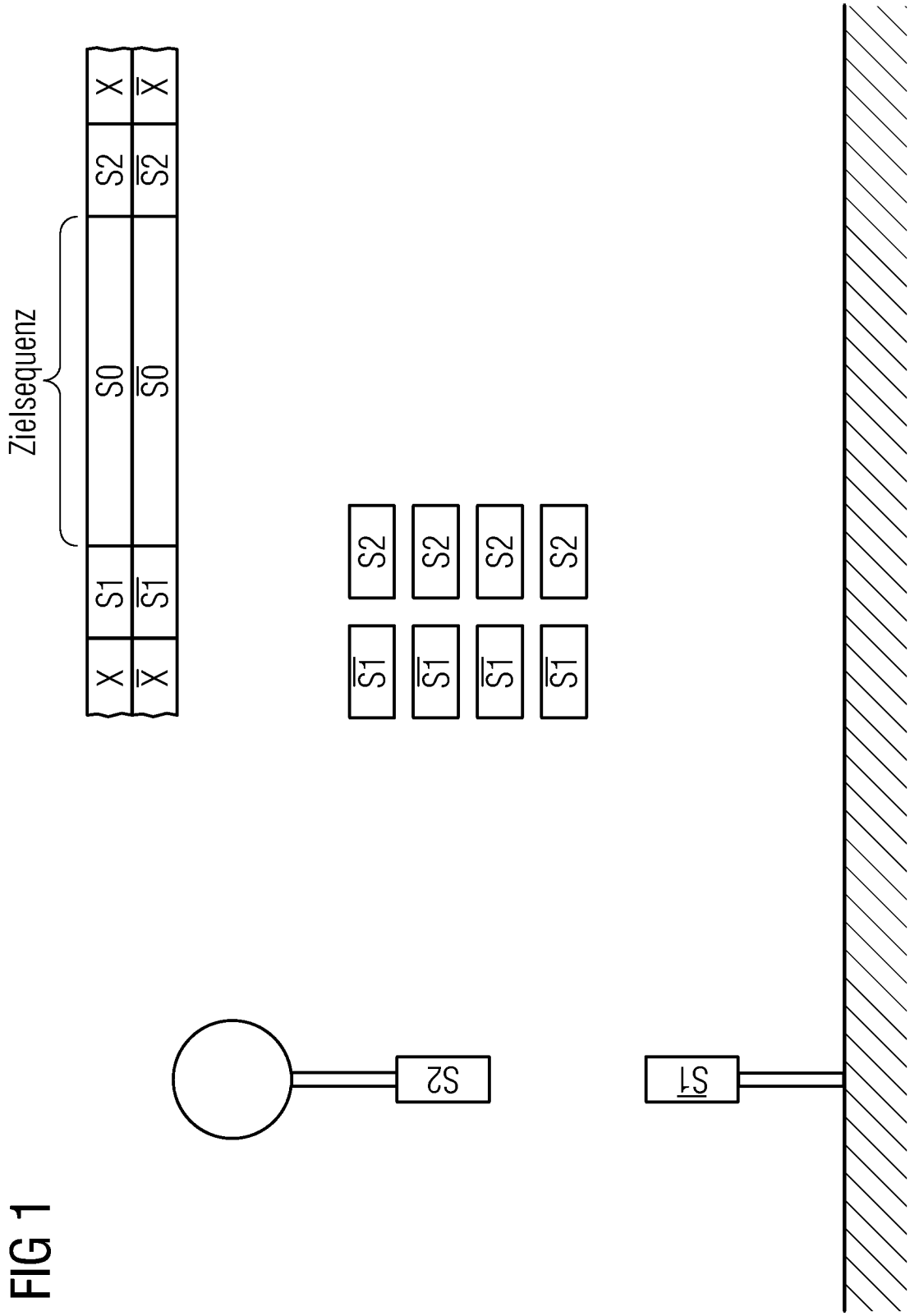


FIG 2

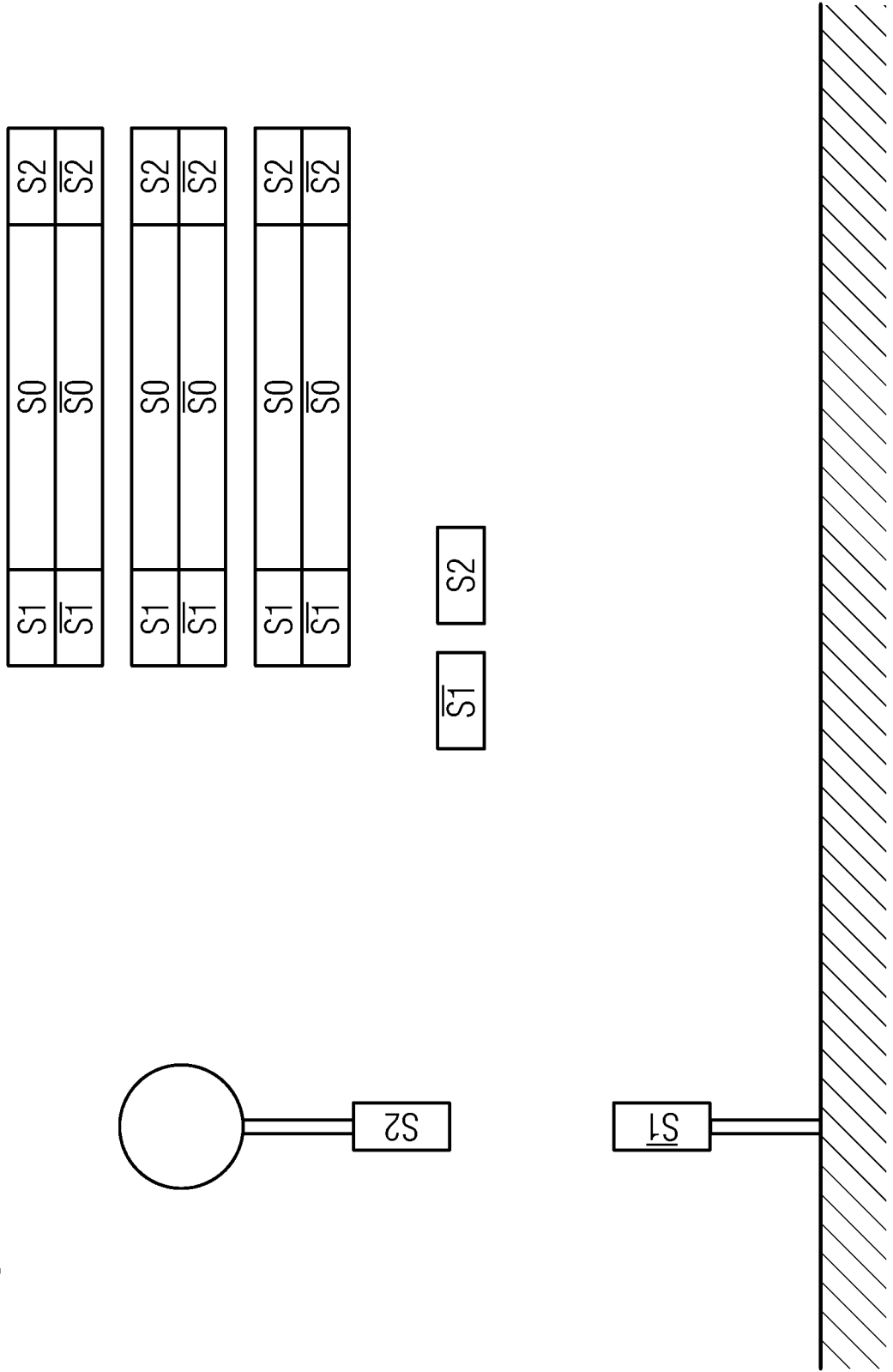
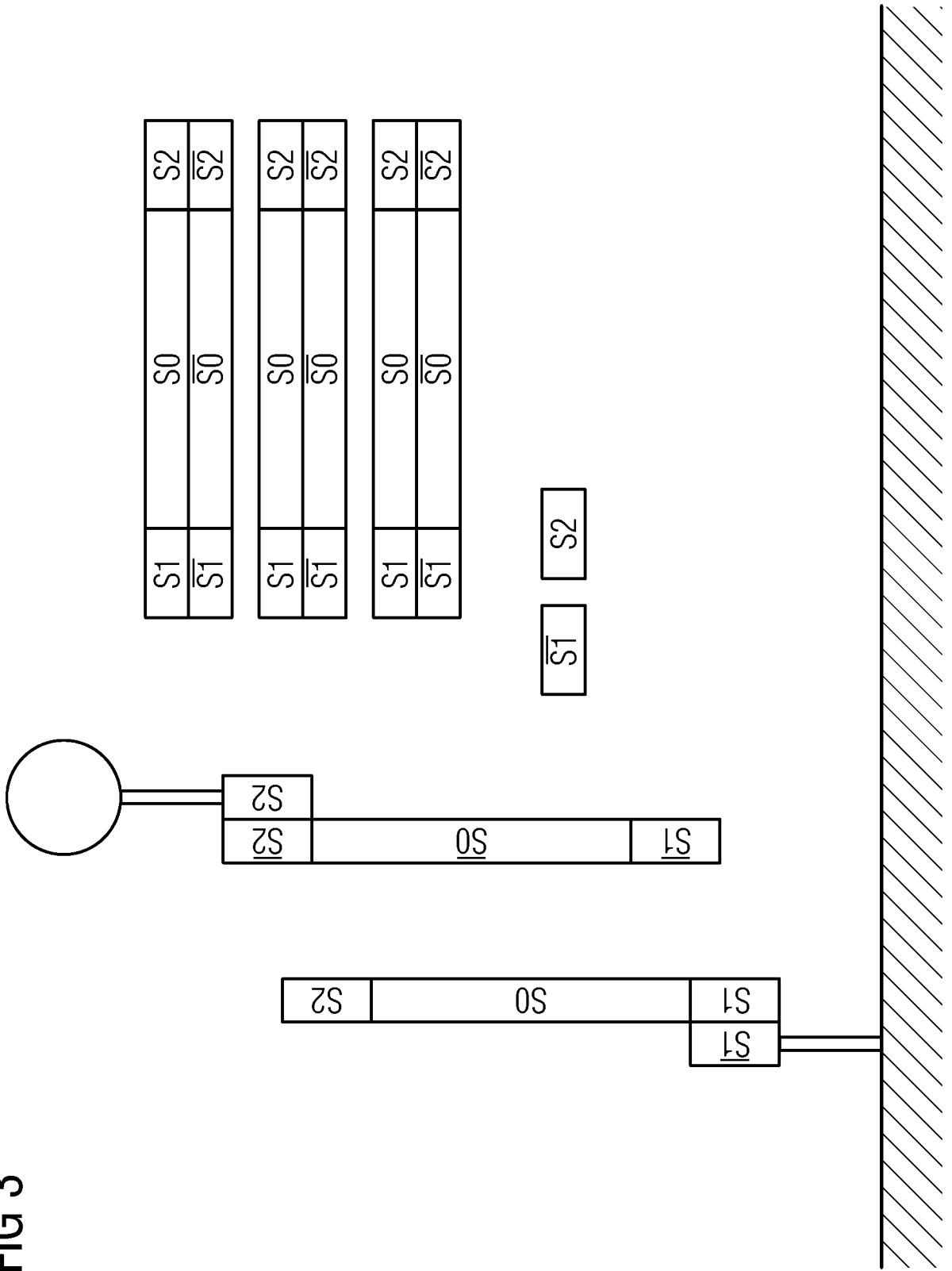


FIG 3



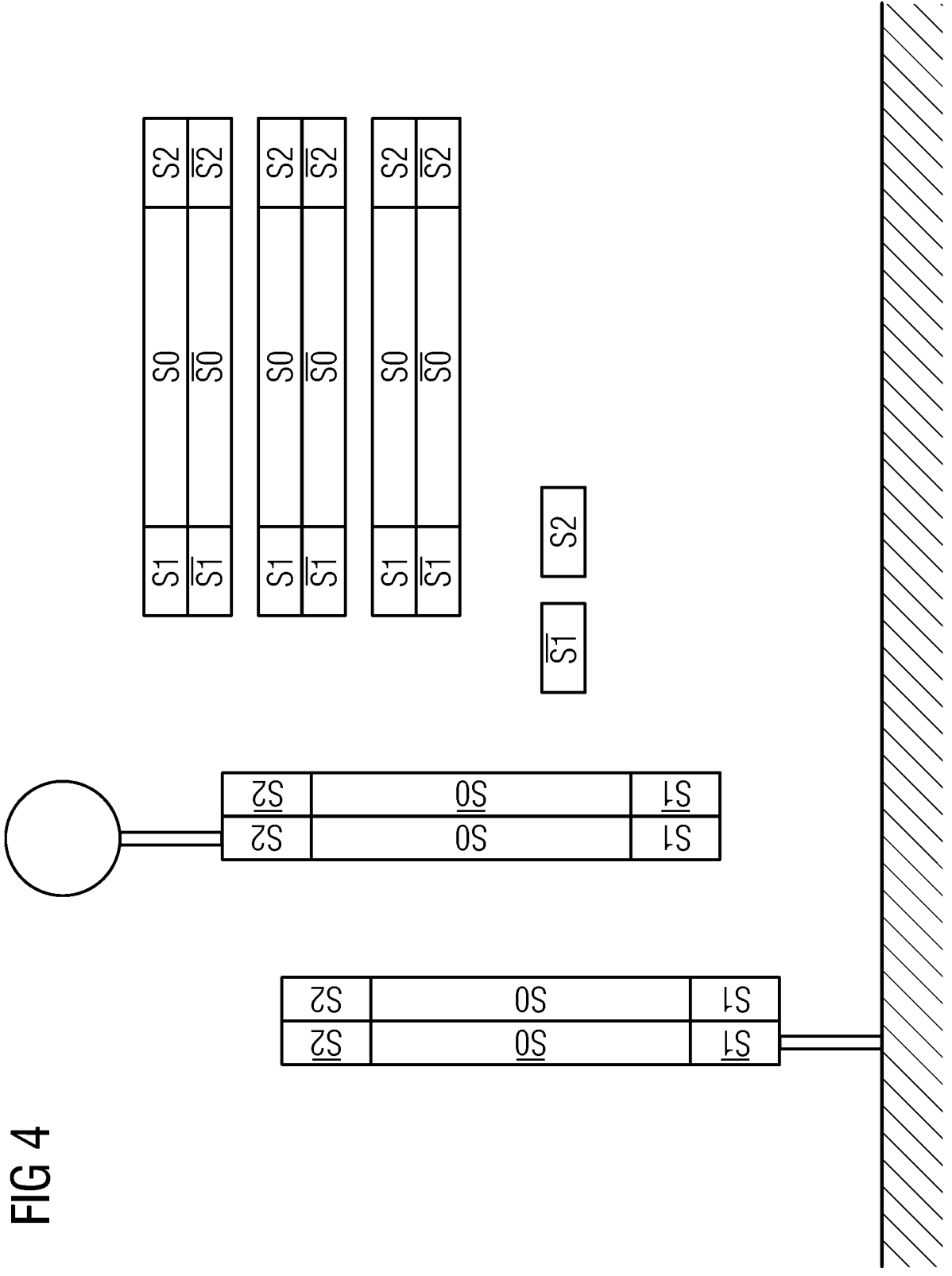


FIG 4

FIG 5

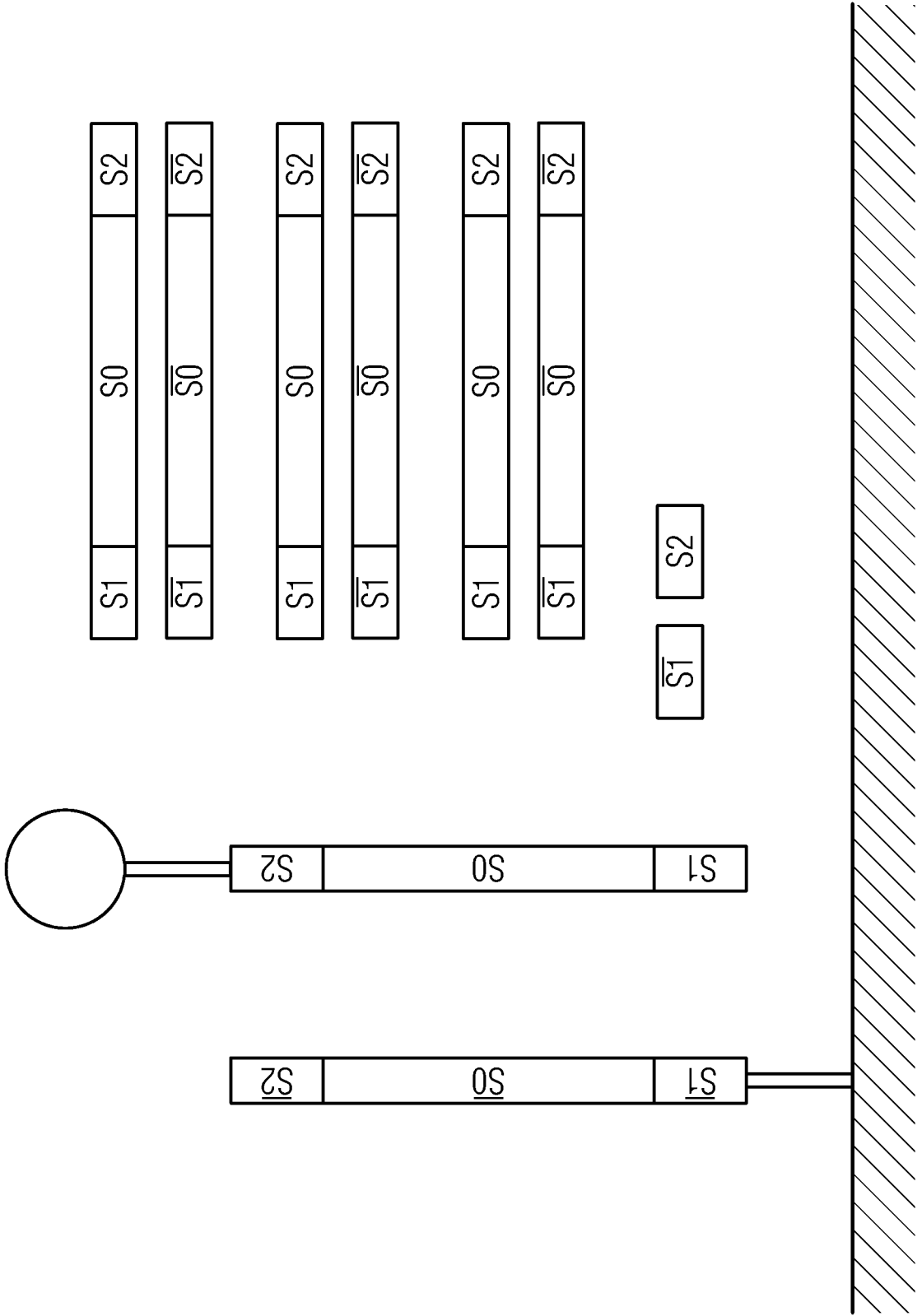
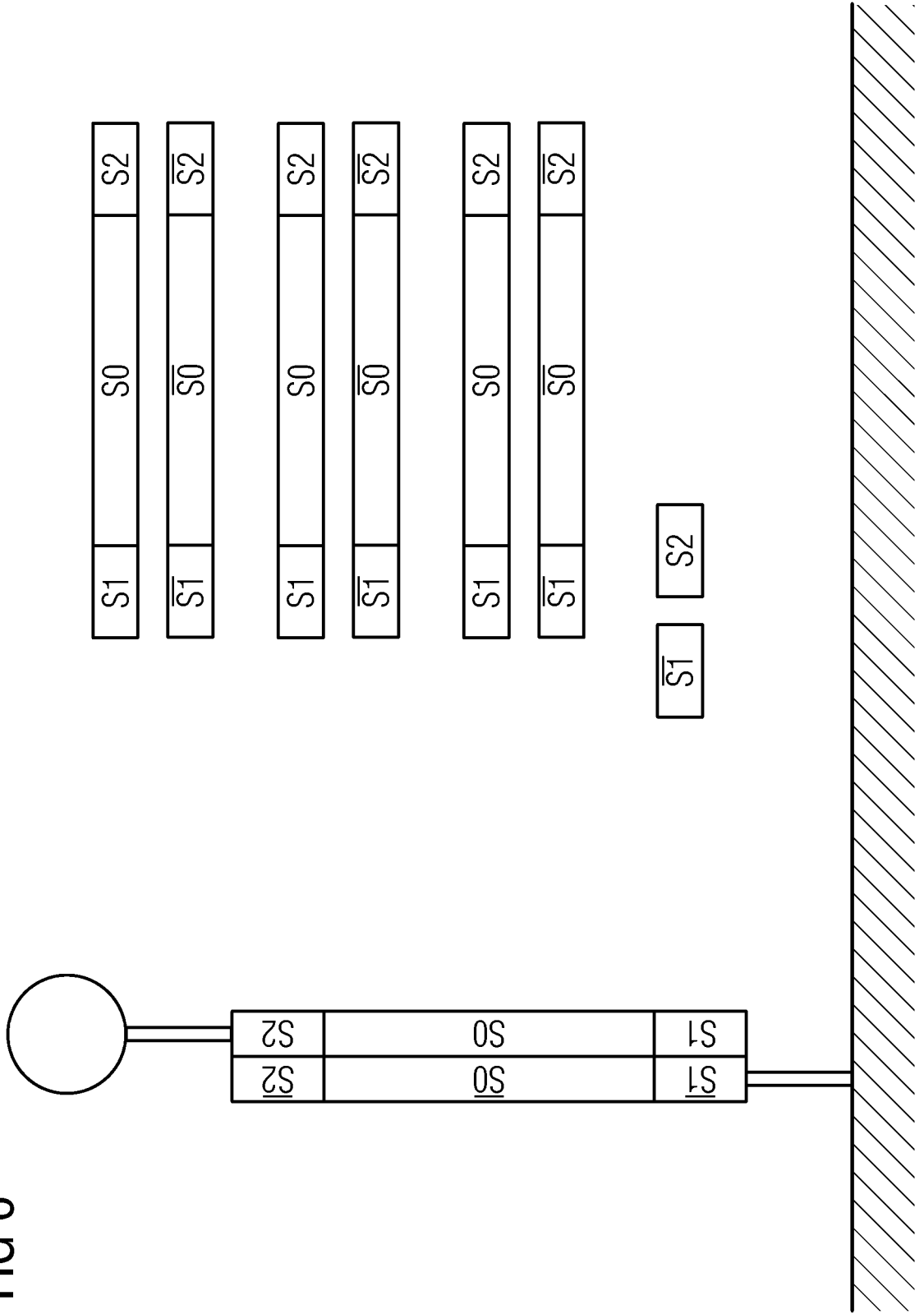


FIG 6



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2006/063470A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/34842 A2 (UNIV CHICAGO [US]; MIKHAILOVICH VLADIMIR [US]; MIRZABEKOV ANDREI [US];) 17 May 2001 (2001-05-17) cited in the application page 14, last paragraph - page 15	1-21
X	STRIZHKOV BORIS N ET AL: "PCR amplification on a microarray of gel-immobilized oligonucleotides: Detection of bacterial toxin- and drug-resistant genes and their mutations" BIOTECHNIQUES, INFORMA LIFE SCIENCES PUBLISHING, WESTBOROUGH, MA, US, vol. 29, no. 4, October 2000 (2000-10), pages 844-857, XP002167651 ISSN: 0736-6205 the whole document	1-21

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 October 2006

Date of mailing of the international search report

27/10/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Reuter, Uwe

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2006/063470

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/47701 A (NOVEMBER AG NOVUS MEDICATUS BE [DE]; BERTLING WOLF [DE]) 23 September 1999 (1999-09-23) cited in the application pages 5-7; figure 4	1-21
X	WO 01/29248 A2 (BIONEX INC [KR]; JANG GI YOUNG [KR]) 26 April 2001 (2001-04-26) examples 3-5	1-21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/063470

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0134842	A2	17-05-2001	AU 3072101 A	06-06-2001
			EP 1246939 A2	09-10-2002
			US 6642000 B1	04-11-2003
WO 9947701	A	23-09-1999	CA 2324249 A1	23-09-1999
			DE 19811731 A1	23-09-1999
			EP 1064408 A1	03-01-2001
			JP 2002506655 T	05-03-2002
			US 6403339 B1	11-06-2002
WO 0129248	A2	26-04-2001	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12Q1/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12Q		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01/34842 A2 (UNIV CHICAGO [US]; MIKHAILOVICH VLADIMIR [US]; MIRZABEKOV ANDREI [US];) 17. Mai 2001 (2001-05-17) in der Anmeldung erwähnt Seite 14, letzter Absatz - Seite 15 -----	1-21
X	STRIZHKOV BORIS N ET AL: "PCR amplification on a microarray of gel-immobilized oligonucleotides: Detection of bacterial toxin- and drug-resistant genes and their mutations" BIOTECHNIQUES, INFORMA LIFE SCIENCES PUBLISHING, WESTBOROUGH, MA, US, Bd. 29, Nr. 4, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 844-857, XP002167651 ISSN: 0736-6205 das ganze Dokument ----- -/--	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</li> <li>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</li> <li>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</li> <li>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</li> <li>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</li> <li>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</li> <li>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</li> <li>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</li> <li>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</li> <li>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</li> </ul>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
17. Oktober 2006		27/10/2006
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Reuter, Uwe

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99/47701 A (NOVEMBER AG NOVUS MEDICATUS BE [DE]; BERTLING WOLF [DE]) 23. September 1999 (1999-09-23) in der Anmeldung erwähnt Seiten 5-7; Abbildung 4 -----	1-21
X	WO 01/29248 A2 (BIONEX INC [KR]; JANG GI YOUNG [KR]) 26. April 2001 (2001-04-26) Beispiele 3-5 -----	1-21

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/063470

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0134842	A2 17-05-2001	AU 3072101 A EP 1246939 A2 US 6642000 B1	06-06-2001 09-10-2002 04-11-2003
WO 9947701	A 23-09-1999	CA 2324249 A1 DE 19811731 A1 EP 1064408 A1 JP 2002506655 T US 6403339 B1	23-09-1999 23-09-1999 03-01-2001 05-03-2002 11-06-2002
WO 0129248	A2 26-04-2001	KEINE	